

9. Государственная система обеспечения единства измерений. Поглощенные дозы фотонного и электронного излучений при установлении стерилизующей и максимальной допускаемой дозы для медицинских изделий, подвергаемых радиационной стерилизации // Москва – 2016

10. Ахметова В.Р. Однореакторный синтез и ростостимулирующая активность в отношении *saccharomycescerevisiae* насыщенных N,S-гетероциклов / В. Р. Ахметова, Р. А. Зайнуллин, Р. Р. Хайруллина, Г. Р. Хабибуллина, Р. В. Кунакова // Уфа: Башкирский химический журнал. – 2014. – Т.21. – №4. – с.143-149.

11. Горлач В.В. Обработка, представление, интерпретация результатов измерений / В.В. Горлач, В.Л. Егоров, Н.А. Иванов Учеб.пособие – Омск: – 2006. – 85с

ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРА МИОЗИНА ОМЕКАМТИВ МЕКАРБИЛ НА АКТИН-МИОЗИНОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ В ЖЕЛУДОЧКАХ И ПРЕДСЕРДИЯХ

¹Кошечева О.И., ²Ощепкова В.Ю., ¹Шаринов М.Р., ²Щепкин Д.В., ²Копылова Г.В.

¹Уральский федеральный университет, ²ИИФ УрО РАН г. Екатеринбург, Россия
nastya.puzanova.97@mail.ru, serkov.s.a@mail.ru

Аннотация. Сердечная недостаточность (СН) сопровождается снижением сократительной функции желудочков сердца, связанным с ингибированием актин-миозинового взаимодействия. Новым подходом компенсации потери сократимости желудочков при СН является модулирование функции миозина с помощью фармацевтических эффекторов, одним из которых является омекамтив мекарбил (ОМ). ОМ увеличивает генерацию силы сердечного миозина. Ничего не известно о модулировании функции миозина предсердий, который отличается от миозина желудочков функциональными особенностями. Мы исследовали влияние ОМ на актин-миозиновое взаимодействие в миокарде желудочков и предсердий, используя *in vitro* подвижную систему (ИПС) и миозин,

изолированный из желудочков и предсердий свиньи. Обнаружено, что ОМ дозозависимым образом уменьшает скорость скольжения как актина, так и тонких нитей, реконструированных из актина, тропонина и тропомиозина, в ИПС. В большей степени снижение скорости скольжения нитей наблюдалось по миозину предсердий: в концентрации 0,5 мкМ ОМ уменьшает скорость тонких нитей по миозину предсердий примерно в 10 раз, а по миозину желудочков – в 4 раза. В концентрации 0,1 мкМ ОМ увеличивал силогенерирующую способность сердечного миозина при максимальной концентрации кальция. Этот эффект был сильнее выражен для миозина желудочков. Таким образом, ОМ замедляет кинетику поперечного мостика и увеличивает силогенерацию миозина из желудочков и предсердий, степень выраженности этого эффекта зависит от изоформ миозина.

Ключевые слова: актин-миозиновое взаимодействие, кальциевая регуляция, сердечный миозин, омекамтив мекарбил, *in vitro* подвижная система.

INFLUENCE OF OMECAMTIV MECARBIL ON THE ACTIN-MYOSIN INTERACTION IN VENTRICLE AND ATRIA

¹Koshcheeva O., ²Oshchepkova V., ¹Sharipov M., ²Shchepkin D., ²Kopylova G.

¹Ural Federal University, ²Institute of Immunology and Physiology, Ekaterinburg, Russia

Abstract. Heart failure is accompanied by a decrease in the contractile function of the ventricles associated with the inhibition of the actin-myosin interaction. A new approach to compensate for the loss of ventricular contractility in heart failure is the modulation of the myosin function using pharmaceutical effectors, one of which is omecamtiv mecarbil (OM). OM increases the force-generation ability of cardiac myosin. Nothing is known about the modulation of the function of atrial myosin, which differs from ventricular myosin by functional features. We studied the effect of OM on the actin-myosin interaction in the myocardium of the ventricles and atria, using an *in motility* assay and myosin isolated from the ventricles and atria of the pig. It was found that OM in a dose-dependent manner reduces the sliding velocity of both actin and thin filaments reconstructed from actin, troponin and tropomyosin over cardiac myosin. To a greater extent, the decrease in the sliding velocity of the filaments was observed over atrial myosin: in a concentration of 0.5 μ M OM decreases the sliding velocity over atrial myosin by 10 times, and over ventricle myosin by 4 times. At a concentration of 0.1 μ M, OM increased the force-generation ability of cardiac myosin at the maximum

calcium concentration. This effect was more pronounced for ventricle myosin. Thus, OM slows the kinetics of the cross-bridge cycle and increases the force-generation ability of myosin from the ventricles and atria, the degree of expression of this effect depends on the myosin isoforms.

Key words: actin-myosin interaction, calcium regulation, cardiac myosin, omecamtiv mecarbil, in vitro motility assay

Сокращение сердца обеспечивается взаимодействием белков сократительного аппарата кардиомиоцитов миозина с актином за счет энергии гидролиза АТФ. При сердечной недостаточности (СН) наблюдается ухудшение сократимости миокарда, которое может быть связано с изменением характеристик актин-миозинового взаимодействия [15]. Новым подходом коррекции таких патологических состояний миокарда является модулирование функции миозина с помощью фармацевтических эффекторов [14], примерами которых являются МУК-461 [2] и омекамтив мекарбил (omecamtiv mecarbil, СК-1827452; ОМ) [5, 14]. ОМ был разработан биофармацевтической компанией Amgen Inc. в сотрудничестве с Cytokinetics для лечения СН и является активатором сердечного миозина [5].

Миозин – сократительный белок поперечно-полосатых мышц, представляет собой гетерогексамер, состоящий из двух тяжелых цепей (ТЦМ), с каждой из которых связаны две легкие цепи (существенная и регуляторная). ТЦМ содержит головку миозина, в которой находятся АТФазный и актин-связывающий центры. ОМ взаимодействует с миозином и активирует головку миозина, ускоряя переход актин-миозинового комплекса из слабосвязанного в сильно-связанное силогенерирующее состояние. ОМ ускоряет высвобождение фосфата, увеличивает продолжительность связи миозина с актином [5, 9, 12], в результате этого увеличивается количество головок миозина, взаимодействующих с тонким филаментом во время систолы [1, 12-13].

В in vitro экспериментах на изолированных кардиомиоцитах из желудочков сердца крыс обнаружено, что ОМ значительно увеличивает силу их сокращения и не влияет на цикл кальция в клетке [5]. ОМ увеличивает скорость и фракцию укорочения у здоровых крыс и крыс с СН. В in vivo исследованиях на собаках с СН, вызванной инфарктом миокарда, наблюдалось значительное улучшение сердечной функции после инфузии с ОМ, а также увеличение толщины стенки желудочка [3]. Результаты второй стадии клинических испытаний показали, что ОМ увеличивает сократимость миокарда и в отличие от используемых лекарственных препаратов не влияет на цикл внутриклеточного кальция в кардиомиоцитах. Выявлено положительное

дозозависимое влияние ОМ на систолическую функцию сердечной мышцы и не выявлено клинически значимых изменений жизненных функций, биохимических показателей крови, электрической активности миокарда или иных побочных эффектов.

На данный момент ничего не известно о модулировании функции миозина с помощью ОМ в предсердиях, которые отличаются от желудочков функциональными и структурными особенностями. Функция предсердий тесно связана с функцией желудочков во время всего сердечного цикла. Одной из важнейших функций предсердий является наполнение желудочков кровью. Согласованное сокращение миокарда предсердий и желудочков обеспечивается в том числе экспрессией изоформ сердечного миозина. В сердце млекопитающих и человека экспрессируется две изоформы ТЦМ – α и β , а также по две изоформы существенных и регуляторных легких цепей – желудочковые и предсердные [1, 8]. В желудочках крупных млекопитающих и человека преобладает β -ТЦМ и легкие цепи желудочкового типа, а в миокарде предсердий преимущественно экспрессируется α -ТЦМ и легкие цепи миозина предсердного типа [8]. Миозин предсердий характеризуется более быстрой кинетикой цикла поперечного мостика и меньшей силогенерирующей способностью по сравнению с миозином желудочков [4]. Кроме этого, миозин предсердий и желудочков по-разному влияют на механизмы кооперативности, играющие важную роль в сокращении миокарда [8, 10]. Поэтому можно предположить, что имеются отличия модулирования функции миозина предсердий с помощью ОМ, которые могут влиять на сократительную функцию предсердий, а значит и всего сердца. Целью работы было исследование влияния ОМ на актин-миозиновое взаимодействие в желудочках и предсердиях сердца с помощью *in vitro* подвижной системы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение белков

Сердечный миозин выделяли из миокарда левого желудочка и левого предсердия свиньи по методу Margossian S.S. & Lowey S. [6]. Полученный миозин хранили при 4° С и использовали в течение пяти дней. Состав изоформ ТЦМ и легких цепей миозина определяли с помощью полиакриламидного гелевого электрофореза с додецил сульфатом натрия [4]. Миозин из миокарда левого желудочка содержал 70% β - и 30 % α -ТЦМ и легкие цепи желудочкового типа. Миозин из миокарда левого предсердия содержал 80% α - и 20% β - ТЦМ и легкие цепи предсердного типа.

Тропонин получали из миокарда левого желудочка свиньи [7]. В связи с тем, что актин является высококонсервативным белком, в работе использовали

скелетномышечный актин, выделенный из m. psoas [7]. Мономерный актин полимеризовали добавлением 1мМ АТФ, 4 мМ MgCl₂ и 100 мМ KCl. Для экспериментов в ИПС филаментарный актин (F-актин) метили 2-кратным молярным избытком TRITC-фаллоидина (Sigma-Aldrich). Рекombинантный сердечный α -тропомиозин человека экспрессировали в клетках E. Coli [7].

В исследовании использовали активатор миозина OM фирмы Selleck Chemicals (Seleckchem.com).

***In vitro* подвижная система (ИПС)**

Суть метода состоит в следующем. С молекулами миозина, иммобилизованными на нитроцеллюлозной поверхности проточной ячейки, взаимодействуют флуоресцентно-меченые тонкие филаменты, содержащие актин, тропонин и ТМ [7]. В присутствии АТФ и Ca²⁺ филаменты скользят по миозину. Изображение движущихся филаментов регистрируется с помощью установки, состоящей из инвертированного флуоресцентного микроскопа и интенсифицированной видеокамеры, записывается на диск компьютера и анализируется с помощью программы GMimPro [7]. Все эксперименты в ИПС были выполнены при температуре 30 °С. Буфер АВ содержал 25 мМ имидазола, 4 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 1 мМ ЭГТА, 10 мМ ДТТ, pH 7,5.

50 мкл сердечного миозина в концентрации 300 мкг/мл загружали в проточную камеру и инкубировали 2 мин. Камера промывалась последовательно буфером АВ с высокой ионной силой, содержащим 500 мМ KCl, и буфером АВ. Для того чтобы заблокировать участки поверхности нитроцеллюлозы, незанятые миозином, в камеру добавляли 50 мкл бычьего сывороточного альбумина (БСА) в концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали в течение 1 мин. Затем добавляли 50 мкл некрашеного F-актина в концентрации 50 мкг/мл в АВ (АВ и 2 мМ АТФ) на 5 мин для блокировки неработающих миозиновых головок. Камера трижды промывалась буфером АВ. Загружалось 50 мкл окрашенного TRITC-фаллоидином F-актина в концентрации 10 нМ, 100 нМ тропонина и 100 нМ тропомиозина в буфере АВ на 7 мин. Камера промывалась раствором, содержащим АВ-буфер с БСА (0,5 мг/мл) и «кислород поглощающей системой», состоящей из глюкозы (3,5 мг/мл), каталазы (0,02 мг/мл), глюкозо-оксидазы (0,15 мг/мл) и 2-меркаптоэтанола (5 мМ). Для инициации движения реконструированных тонких филаментов добавляли буфер АВ, содержащий «кислород поглощающей системой», 2 мМ АТФ и необходимую концентрацию кальция, рассчитанную с помощью программы Maxchelator (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxcS.html>).

Определение скорости скольжения филаментов. Определение скорости скольжения филаментов осуществлялось с помощью программы GMimPro, разработанной в Национальном институте медицинских исследований (Лондон, Великобритания) и доступной по адресу: www.nimr.mrc.ac.uk/gmimpro. Для определения скорости скольжения филаментов записывали не менее 10 полей из разных частей одной проточной камеры. Длительность записи составляла 30 с, интервал между кадрами – 500 мс. Для каждого филамента было измерено более 10 дистанций с равными промежутками времени. Для каждого филамента определялась его средняя скорость за время его перемещения и стандартное отклонение. Только те филаменты, которые имели стандартное отклонение средней скорости менее 40 %, использовались для дальнейших расчетов, так как только они двигались непрерывно и равномерно. Распределение скоростей в поле зрения микроскопа имело вид нормального распределения. Обработывалось от 10 до 20 филаментов в поле зрения микроскопа.

Измерение силы миозина в ИПС. Измерение относительной силы, развиваемой головками миозина проводили, используя в качестве нагрузки NEM-модифицированный миозин [11]. Для определения изометрической силы миозина в ячейку загружали смесь не обработанного и NEM-модифицированного миозина, содержание последнего в смеси постепенно увеличивали и определяли скорость скольжения филаментов в зависимости от его процентного содержания. Зависимость скорости филаментов от процентного содержания NEM-модифицированного миозина аппроксимировали линейной функцией и определяли ту концентрацию NEM-миозина, при которой скорость становится равной 0 мкм/с, и сила выражалась как процентное содержание NEM-миозина в смеси.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для достижения цели исследования были поставлены две задачи: 1 – исследовали влияние ОМ на скорость скольжения тонких филаментов, содержащих актин, тропонин и тропомиозин, по миозину желудочков и предсердий в ИПС; 2 – оценили влияние ОМ на силогенерирующую способность миозина желудочков и предсердий.

Влияние ОМ на скорость скольжения тонких филаментов

Исследовано влияние ОМ на скорость скольжения тонких филаментов, содержащих актин, тропонин и тропомиозин, по сердечному миозину. Для этого получена зависимость скорости скольжения тонких филаментов от концентрации ОМ по миозину желудочков и предсердий в ИПС (рис. 1). Обнаружено, что ОМ уменьшает скорость скольжения тонких филаментов по

миозину в дозо-зависимой манере, и ОМ оказывает более выраженное влияние на скорость скольжения филаментов по миозину предсердий. Так при добавлении 0.5 мкМ ОМ к миозину предсердий уменьшает скорость филаментов более, чем в 10 раз, а к миозину желудочков – ~ в 4 раза.

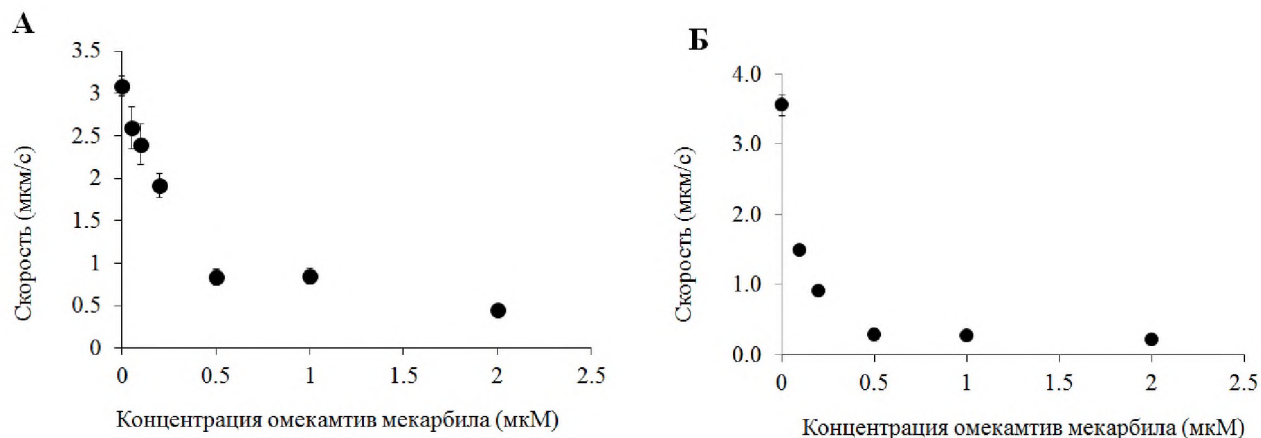


Рисунок 1 - Зависимость скорости скольжения тонких филаментов от концентрации омекамтив мекарбил по миозину желудочков (А) и предсердий (Б) при насыщающей концентрации кальция в *in vitro* подвижной системе.

Влияние ОМ на силогенерирующую способность миозина

Используя NEM-миозин в качестве нагрузки оценили влияние ОМ на силогенерирующую способность миозина желудочков и предсердий (рис. 2). ОМ в концентрации 0.1 мкМ увеличивает сиогенерирующую способность сердечного миозина. Причем, сила миозина желудочков растет в большей степени.

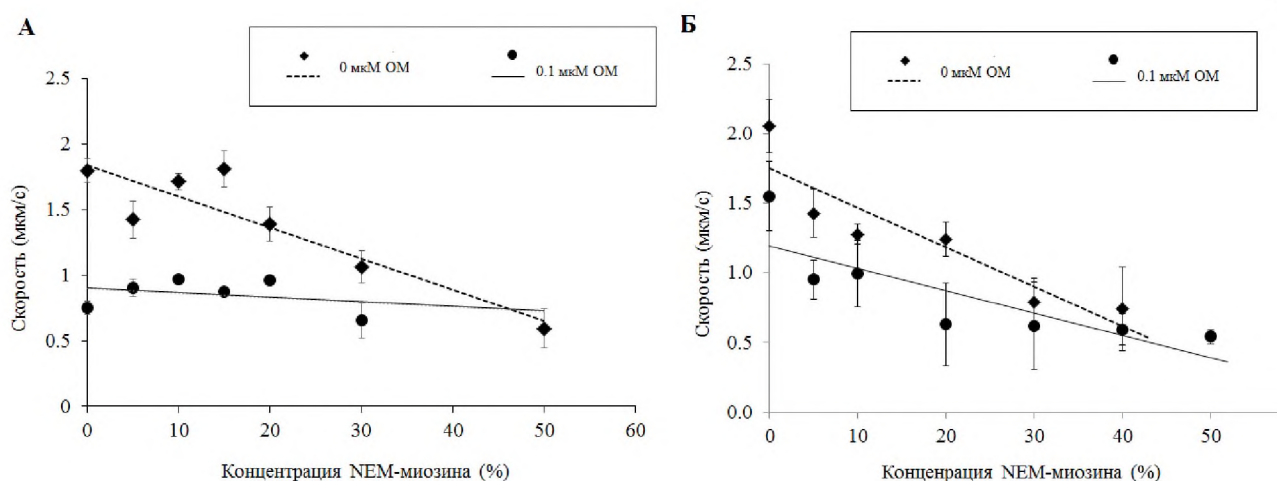


Рисунок 2 - Влияние 0.1 мкМ ОМ на силогенерирующую способность миозина желудочков (А) и предсердий (Б).

Исследовано влияние ОМ на скорость скольжения тонких филаментов по миозину желудочков и предсердий в *in vitro* подвижной системе. Обнаружено,

что ОМ в большей степени подавляет скорость скольжения тонких филаментов по миозину предсердий, чем по миозину желудочков. Используя NEM-миозин в качестве нагрузки, оценили влияние ОМ на силогенерирующую способность миозина желудочков и предсердий. Показано, что ОМ в концентрации 0.1 мкМ в большей степени увеличивает силогенерирующую способность миозина желудочков, чем предсердий.

Таким образом, ОМ по-разному влияет на кинетические (скорость скольжения филаментов в *in vitro* подвижной системе) и механические (сила) характеристики миозина предсердий и желудочков. Полученные результаты будут способствовать пониманию фундаментальных основ сокращения миокарда, а также поиску терапевтических мишеней для компенсации потери мощности сократимости сердца вследствие заболеваний, связанных с нарушением функции белков саркомера.

Работа поддержана РФФИ (№18-015-00252) и Государственной программой АААА-А18-118020590135-3.

Список литературы:

1. Hoh J. F. Y., McGrath P. A., Hale P. T. Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin - effects of hypophysectomy and thyroxine replacement // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 1978. – Т. 10, № 11. – С. 1053-1076.
2. Kawas R. F., Anderson R. L., Ingle S. R. B., Song Y. H., Sran A. S., Rodriguez H. M. A small-molecule modulator of cardiac myosin acts on multiple stages of the myosin chemomechanical cycle // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – Т. 292, № 40. – С. 16571-16577.
3. Komamura K., Shannon R. P., Pasipoularides A., Ihara T., Lader A. S., Patrick T. A., Bishop S. P., Vatner S. F. Alterations in left-ventricular diastolic function in conscious dogs with pacing-induced heart-failure // *Journal of Clinical Investigation*. – 1992. – Т. 89, № 6. – С. 1825-1838.
4. Kopylova G., Nabiev S., Nikitina L., Shchepkin D., Bershtitsky S. The properties of the actin-myosin interaction in the heart muscle depend on the isoforms of myosin but not of alpha-actin // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2016. – Т. 476, № 4. – С. 648-653.
5. Malik F. I., Hartman J. J., Elias K. A., Morgan B. P., Rodriguez H., Brejc K., Anderson R. L., Sueoka S. H., Lee K. H., Finer J. T., Sakowicz R., Baliga R., Cox D. R., Garard M., Godinez G., Kawas R., Kraynack E., Lenzi D., Lu P. P., Muci A., Niu

C. R., Qian X. P., Pierce D. W., Pokrovskii M., Suehiro I., Sylvester S., Tochimoto T., Valdez C., Wang W. Y., Katori T., Kass D. A., Shen Y. T., Vatner S. F., Morgans D. J. Cardiac Myosin Activation: A Potential Therapeutic Approach for Systolic Heart Failure // *Science*. – 2011. – T. 331, № 6023. – C. 1439-1443.

6. Margossian S. S., Lowey S. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal-muscle // *Methods in Enzymology*. – 1982. – T. 85. – C. 55-71.

7. Matyushenko A. M., Shchepkin D. V., Kopylova G. V., Popruga K. E., Artemova N. V., Pivovarova A. V., Bershitsky S. Y., Levitsky D. I. Structural and Functional Effects of Cardiomyopathy-Causing Mutations in the Troponin T-Binding Region of Cardiac Tropomyosin // *Biochemistry*. – 2017. – T. 56, № 1. – C. 250-259.

8. Morano I. Effects of different expression and posttranslational modifications of myosin light-chains on contractility of skinned human cardiac fibers // *Basic Research in Cardiology*. – 1992. – T. 87. – C. 129-141.

9. Morgan B. P., Muci A., Lu P. P., Qian X. P., Tochimoto T., Smith W. W., Garard M., Kraynack E., Collibee S., Suehiro I., Tomasi A., Valdez S. C., Wang W. Y., Jiang H., Hartman J., Rodriguez H. M., Kawas R., Sylvester S., Elias K. A., Godinez G., Lee K., Anderson R., Sueoka S., Xu D. H., Wang Z. P., Djordjevic N., Malik F. I., Morgans D. J. Discovery of Omecamtiv Mecarbil the First, Selective, Small Molecule Activator of Cardiac Myosin // *Acs Medicinal Chemistry Letters*. – 2010. – T. 1, № 9. – C. 472-477.

10. Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Nikitina L.V. Study of reciprocal effects of cardiac myosin and tropomyosin isoforms on actin–myosin interaction with in vitro motility assay // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2011 – T. 415. – C. 104-108.

11. Shchepkin D. V., Nabiev S. R., Kopylova G. V., Matyushenko A. M., Levitsky D. I., Bershitsky S. Y., Tsaturyan A. K. Cooperativity of myosin interaction with thin filaments is enhanced by stabilizing substitutions in tropomyosin // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2017. – T. 38, № 2. – C. 183-191.

12. Solaro R. J. CK-1827452, a sarcomere-directed cardiac myosin activator for acute and chronic heart disease // *Idrugs*. – 2009. – T. 12, № 4. – C. 243-251.

13. Teerlink J. R. A novel approach to improve cardiac performance: cardiac myosin activators // *Heart Failure Reviews*. – 2009. – T. 14, № 4. – C. 289-298.

14. van der Velden J., Ho C. Y., Tardiff J. C., Olivotto I., Knollmann B. C., Carrier L. Research priorities in sarcomeric cardiomyopathies // *Cardiovascular Research*. – 2015. – T. 105, № 4. – C. 449-456.